

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
4. August 2005 (04.08.2005)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 2005/070453 A1**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **A61K 39/275**,  
35/76, C12N 7/06, 7/08

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2005/000582

(22) Internationales Anmeldedatum:  
21. Januar 2005 (21.01.2005)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
10 2004 003 572.5 23. Januar 2004 (23.01.2004) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von  
US): **BAVARIAN NORDIC A/S** [DK/DK]; Bøgskovvej  
9, DK-3490 Kvistgaard (DK).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **MAYR, Anton**  
[DE/DE]; Weilheimer Strasse 1, 82319 Starnberg (DE).  
**MAYR, Barbara** [DE/DE]; Weilheimer Strasse 1, 82319  
Starnberg (DE).

(74) Anwalt: **PIELKEN, Petra**; Bavarian Nordic GmbH,  
Fraunhoferstrasse 13, 82152 Martinsried (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für  
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,  
AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,

CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,  
GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,  
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,  
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,  
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM,  
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM,  
ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für  
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,  
GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,  
ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,  
TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,  
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL,  
PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,  
CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Erklärung gemäß Regel 4.17:**

— Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US

**Veröffentlicht:**

— mit internationalem Recherchenbericht  
— vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden  
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen  
eintreffen  
— mit Angaben über hinterlegtes biologisches Material, ein-  
gereicht gemäss Regel 13bis, getrennt von der Beschrei-  
bung

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-  
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-  
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der  
PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: MONOPARAIMMUNITY INDUCERS BASED ON ATTENUATED RABBIT MYXOMA VIRUSES

(54) Bezeichnung: MONOPARAMUNITÄTSINDUCER BASIEREND AUF ATTENUIERTEN MYXOMAVIREN DES KANIN-  
CHENS

(57) Abstract: The invention relates to monoparaimmunity inducers that are based on paraimmunizing viruses or viral components of a myxoma virus strain of diseased rabbits that show the general symptoms of the disease. The invention also relates to a method for producing the inventive inducers and to their use as drugs for the regulatory optimization of the paraimmunizing activities for use in the prophylaxis and therapy of various human and animal dysfunctions.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft Monoparamunitätsinducer auf der Basis von paramunisierenden Viren oder Viruskomponenten eines Myxomavirus-Stammes von typisch generalisierend erkrankten Kaninchen, ein Verfahren zur deren Herstellung und deren Verwendung als Arzneimittel zur regulativen Optimierung der paramunisierenden Aktivitäten für die Prophylaxe und Therapie von diversen Dysfunktionen bei Mensch und Tier.



WO 2005/070453 A1

MONOPARAMUNITÄTSINDUCER  
BASIEREND AUF ATTENUIERTEN MYXOMAVIREN DES KANINCHENS

- 5 Die Erfindung betrifft Monoparamunitätsinducer auf der Basis von paramunisierenden Viren oder Viruskomponenten, dadurch gekennzeichnet, dass die Viren oder Viruskomponenten aus einem attenuierten Myxomavirus-Stamm des Kaninchens stammen, ein Verfahren zur Herstellung der Monoparamunitätsinducer und deren Verwendung als Arzneimittel.
- 10 Das körpereigene Immunsystem von hochentwickelten Organismen, insbesondere das der Säuger und Vögel, umfasst einen antigenspezifischen sowie einen antigenunspezifischen Teil. Beide Teile des Immunsystems sind miteinander vernetzt und stehen dabei in gegenseitiger Wechselwirkung. Die antigenspezifischen Mechanismen sind für den Aufbau der Immunität, die antigenunspezifischen für den Aufbau der Paramunität verantwortlich.
- 15 Paramunität bezeichnet den Zustand eines gut regulierten und optimal funktionierenden unspezifischen Abwehrsystems, verbunden mit einem schnell entstandenen, zeitlich limitierten, erhöhten Schutz gegenüber einer Vielzahl unterschiedlicher Erreger, Antigene und anderer Noxen. Grundlage für die Entstehung von Paramunität sind aus historischen und funktionellen Gründen die, aus phylogenetischer Sicht alten, sogenannten primitiven,
- 20 nichtselektiven und bedingt selektiven paraspezifischen Abwehrmechanismen.

Die paraspezifischen Aktivitäten des antigenunspezifischen Immunsystems (engl.: „innate immune system“) umfassen nichtselektive Schutzelemente, wie zum Beispiel fremdmaterialfressende Organellen, sowie bedingt selektive Schutzelemente, wie zum

25 Beispiel Mikro- und Makrophagen, natürliche Killerzellen, dendritische Zellen und lösliche Faktoren wie Zytokine, die entsprechend ihrer Genese erregerspezifisch bzw. antigenunspezifisch reagieren.

Paraspezifische Aktivitäten sind im betreffenden Organismus unmittelbar nach

30 Antigenkontakt zu verzeichnen, während die Wirkungen des antigenspezifischen Immunsystems erst nach Tagen oder Wochen eintreten.

Bei den höher organisierten Lebewesen wird hierdurch zusätzlich Zeit gewonnen, um spezifische Abwehrsysteme gegenüber den Noxen aufzubauen, die noch nicht eliminiert

35 werden konnten und antigene Eigenschaften besitzen.

Der Nutzen der Paramunisierung, d.h. der paraspezifischen Aktivitäten des Immunsystems für die Prophylaxe und Therapie bei einem Patienten hat sich seit deren Entwicklung in immer deutlicher Weise gezeigt (Anton Mayr, „Paramunisierung: Empirie oder Wissenschaft“, Biol. Med., Aufl. 26(6): 256-261, 1997). Die paraspezifische Abwehr ermöglicht es dem  
5 Organismus, sich bei Konfrontation mit den unterschiedlichsten Fremdstoffen, Infektionserregern, Toxinen und transformierten körpereigenen Zellen sofort zur Wehr zu setzen.

Zwischen den paraspezifischen und den spezifischen Aktivitäten des Immunsystems  
10 bestehen enge Wechselwirkungen, wobei der Informationsfluss in der Regel vom zuerst reagierenden, paraspezifischen zum später einsetzenden, spezifischen Teil des Immunsystems verläuft (z.B. bei der Antigenvermittlung). Die paraspezifische Abwehr des Organismus kann auf diese Weise bei Infektionen mit besonders virulenten Pathogenen die  
15 Zeit bis zur Ausbildung der spezifischen Immunität (z.B. Antikörper, Immunzellen) überbrücken.

Die paraspezifische Immunabwehr ist ein physiologischer Vorgang und lässt sich als „primäre Kontrolle“ bei der Auseinandersetzung mit der Umwelt definieren. Sie ist nicht nur für die niederen Organismen, sondern insbesondere auch für die höher- und  
20 hochentwickelten Wirbeltiere unersetzlich. Primäre kongenitale Defekte in diesem biologischen Abwehrsystem führen zu lebensbedrohenden Situationen. Als Beispiel ist das „Chediak-Steinbrinck-Higashi-Syndrom“ des Menschen zu nennen, das durch Granulozytendefekte und Dysfunktionen der natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) charakterisiert ist und in den meisten Fällen bis zur Vollendung des 10. Lebensjahrs zum  
25 Tode des Patienten führt.

Der Zustand der Paramunität ist durch eine erhöhte Phagozytoserate, eine erhöhte Funktion der spontanen zellvermittelten Zytotoxizität (NK-Zellen) und eine erhöhte Aktivität sonstiger lymphoretikulärer Zellen gekennzeichnet. Gleichzeitig kommt es zur Freisetzung bestimmter  
30 Zytokine, die sowohl mit den zellulären Elementen als auch untereinander stimulierend und/oder hemmend (z.B. über Repressormechanismen) wirken. Dieses eng vernetzte und stufenweise reagierende biologische System der Paramunität mit seinen unterschiedlichen Akzeptor-, Effektor- und Zielzellen sowie den signalübertragenden Zytokinen ist daneben intensiv mit dem Hormon- und Nervensystem verbunden. Es stellt dadurch einen wichtigen  
35 Bestandteil des Kommunikations-, Interaktions- und Regulationsnetzwerkes dar.

Die Einleitung der Paramunität erfolgt durch Paramunisierung. Darunter versteht man die medikamentöse Aktivierung der zellulären Elemente des paraspezifischen Teils des Immunsystems und der damit verbundenen Bildung von Zytokinen, mit dem Ziel, Dysfunktionen zu beseitigen, den nichterreger- und nicht antigenspezifischen Schutz eines Individuums schnell zu erhöhen (optimale Bioregulation), eine durch Stressfolgen oder anderweitig (z.B. medikamentös) entstandene Immunsuppression oder Immunschwäche zu beseitigen, Defizite zu reparieren und/oder regulatorisch zwischen Immun-, Hormon- und Nervensystem zu wirken. Dies bedeutet, dass je nach Art der Paramunisierung und der Reaktionslage, wie zum Beispiel der Gesundheitslage des Patienten, bestimmte unspezifische, körpereigene Abwehrvorgänge gesteigert, ergänzt oder auch gedämpft werden können.

Für die Paramunisierung verwendet man Paramunitätsinducer, an die bestimmte Unschädlichkeits- und Wirksamkeitskriterien gestellt werden, wodurch sie sich von Immunstimulanzien unterscheiden. Der Paramunitätsinducer *per se* ist weder mit einem Abwehrstoff, noch mit einer Chemikalie, einem Antibiotikum, Vitamin oder Hormon vergleichbar. Vielmehr aktiviert er über einen stufenweisen Mechanismus das paraspezifische Immunsystem, so dass dieses ausreichend zelluläre und humorale Abwehrmechanismen mobilisiert. Der Paramunitätsinducer wirkt hierbei sowohl regulierend als auch reparierend hinsichtlich der Immunabwehr. Bezüglich der Wirkungsweise von Paramunitätsinducer ist bekannt, dass sie von phagozytierenden Zellen (Akzeptorzellen) aufgenommen werden, die dadurch aktiviert werden und Mediatoren entlassen, welche wiederum Effektorzellen mobilisieren. Diese schalten schließlich die Regulationsmechanismen der paraspezifischen Abwehr ein.

Multiple Paramunitätsinducer auf der Basis von Kombinationen zweier oder mehrerer Pockenviruskomponenten, die sich aus unterschiedlichen Pockenvirus-Stämmen mit paramunisierenden Eigenschaften ableiten, sind in der europäischen Patentschrift EP 0 669 133 B1 beschrieben.

Die vorliegende Erfindung basiert auf den paramunisierenden Eigenschaften von attenuierten Myxomaviren und/oder ihren Virusbestandteilen.

Eine Attenuierung bezeichnet die Umwandlung der Eigenschaften eines Infektionserregers, die zur Abschwächung des Erregers führen (engl. „attenuate“ = abschwächen, mildern). Veränderungen von Infektionserregern treten in der Natur spontan häufig auf, wobei die Zeitspannen über viele Jahrhunderte reichen können.

Experimentell kann man die Wandlungsfähigkeit von Infektionserregern, sich an Umweltveränderungen anzupassen, nutzen und die zur Attenuierung benötigte Zeitspanne, z.B. durch Dauerpassagen in bestimmten Wirtssystemen, drastisch verkürzen. Bisher nutzte man die Attenuierung zur Gewinnung von avirulenten Impfstämmen sowie von unschädlichen Paramunitätsinducern.

In der Regel führt eine Attenuierung zum Verlust der Virulenz und Kontagiosität, der Verminderung der immunisierenden Eigenschaften und des Wirtsspektrums sowie zu geringen Veränderungen im Erregergenom mit Auftreten von Deletionen, bevorzugt in den terminalen Bereichen. Parallel kommt es in der Regel zu einer Zunahme der paramunisierenden Aktivitäten des modifizierten Erregers.

In seltenen Fällen kann eine Attenuierung, vor allem beim Versuch einer experimentellen Attenuierung durch gentechnische Manipulationen, auch zu einer Erhöhung der Virulenz und Kontagiosität führen.

Myxomaviren sind die Erreger der Myxomatose, eine zyklisch verlaufende, kontagiöse Virusallgemeinkrankheit der Wild- und Hauskaninchen, die durch generalisierte, teilweise hämorrhagische Unterhautödeme am Kopf und über den ganzen Körper, mit Bevorzugung der Analgegend, der Vulva und des Schlauches, wie keine andere Infektionskrankheit charakterisiert ist. Wird die Myxomatose in ein bisher seuchenfreies Land neu eingeschleppt, verläuft sie rasch und tödlich. Nach Sesshaftwerden des Virus verändert sich der Seuchencharakter bis hin zu klinisch inapparenten Infektionen (Mayr A.: Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre, 7. Aufl., Enke-Verlag, Stuttgart, 2002).

Die Krankheit ist unter amerikanischen Baumwollschwanzkaninchen der Gattung *Sylvilagus*, die ausschließlich die neue Welt besiedeln, weit verbreitet. Diese Wildkaninchen bilden das einzige natürliche Reservoir der Seuche. Die Infektion verläuft bei ihnen in einer milden Form. Dagegen besitzt die Erkrankung bei europäischen Wild- und Hauskaninchen der Gattung *Oryctolagus*, die auch in Australien heimisch sind, eine fast 100%ige Sterblichkeit bei Neueinschleppung des Erregers.

Das natürliche Wirtsspektrum des Myxomavirus (Genus *Leporipoxvirus*) ist eng begrenzt. Im Allgemeinen vermehrt sich das Virus nur in amerikanischen Baumwollschwanzkaninchen und in europäischen Haus- und Wildkaninchen. Vereinzelt wurden allerdings auch

Infektionen in europäischen Wildhasen beobachtet. Übertragungsversuche auf andere Tierarten und auf den Menschen verliefen negativ.

Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, neue Monoparamunitätsinducer für die Humanmedizin und Veterinärmedizin bereitzustellen. Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht darin, ein Verfahren zur Herstellung solcher Monoparamunitätsinducer bereitzustellen. Ferner ist es Aufgabe der vorliegenden Erfindung, pharmazeutische Zusammensetzungen zur Verwendung als Arzneimittel auf der Basis von Monoparamunitätsinducern bereitzustellen.

Entsprechend betrifft die vorliegende Erfindung Monoparamunitätsinducer auf der Basis von paramunisierenden Viren oder Viruskomponenten, dadurch gekennzeichnet, dass die Viren oder Viruskomponenten von einem attenuierten Myxomavirus-Stamm des Kaninchens stammen. Vorzugsweise umfassen die Viruskomponenten paramunisierende Virushüllen oder aberrante Formen von Virushüllen eines attenuierten Myxomavirus-Stammes. Bevorzugte Stämme, welche die erfindungsgemäßen paramunisierenden Eigenschaften aufweisen, sind die Stämme M-2, M-7, Lausanne, Aust/Uriarra/Verg-86/1. Die Stämme M-7, Lausanne, Aust/Uriarra/Verg-86/1 sind auch für die Herstellung von Lebend-Vaccinen geeignet, da sie nur partiell in ihrer Virulenz abgeschwächt sind, um ausreichend immunisierend zu wirken.

Besonders bevorzugt ist ein Monoparamunitätsinducer der auf dem Myxomavirus-Stamm M-2 basiert. Ein attenuierter Myxomavirus-Stamm, hergestellt nach dem unten beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahren ist bei der Hinterlegungsstelle der Public Health Laboratory Service (PHLS), Centre for Applied Microbiology & Research, European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC), Salisbury, Wiltshire, United Kingdom mit der Hinterlegungsnummer 03121801 hinterlegt worden.

Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Herstellung von Monoparamunitätsinducern basierend auf einem attenuierten Myxomavirus-Stamm des Kaninchens. Dafür werden zunächst Myxomaviren aus infiziertem Gewebe eines typisch an einer generalisierten Myxomatose erkrankten Kaninchens isoliert. Anschließend erfolgt eine Adaptierung des Virus an ein permissives Zellsystem, d.h. an ein Zellmaterial, das die Vermehrung des Virus erlaubt, wie beispielsweise Zellkulturen, bebrütete Hühnereier oder auch Versuchstiere. Insbesondere können Zellen des natürlichen Wirts oder einer mit dem Wirt nahe verwandten Spezies für die Adaptierung verwendet werden. Als permissive Zellsysteme für Myxomaviren

eignen sich beispielsweise Hühnerembryofibroblasten (FHE) wie auch aus Kaninchennieren oder -hoden hergestellte Zellkulturen.

Als erfindungsgemäß bevorzugt ist die Adaptierung des isolierten Myxomavirus auf die Chorioallantoismembran (CAM) bebrüteter Hühnereier über eine oder mehrere Passagen, bevorzugt über 2 bis 6 Passagen und besonders bevorzugt über 3 Passagen. Dafür werden zur Adaptierung die isolierten Viren auf die CAM geimpft und über Passagierung auf der CAM vermehrt.

Vorzugsweise werden die Myxomaviren aus infiziertem Gewebe durch Vermehrung in einem permissiven Zellsystem zunächst isoliert. Dafür kann ein permissives Zellsystem beispielsweise mit infiziertem, durch Aufschluß gewonnenem Gewebehomogenat beimpft werden. Anschließend werden die durch erste Vermehrung gewonnenen Viren entweder weiter an denselben, permissiven Zellsystemtypen, der auch bereits für die Isolierung verwendet wurde, adaptiert, oder es wird ein anderes, weiteres permissives Zellsystem verwendet. Bevorzugt ist die Adaptierung des Virus an denselben permissiven Zellsystemtypen, der auch für die Isolierung verwendet wird. Somit werden vorzugsweise Myxomaviren aus infiziertem Gewebe durch Vermehrung in einem permissiven Zellsystem isoliert und anschließend an das permissive Zellsystem durch weitere Passagen adaptiert. Besonders bevorzugt ist eine erste Anzucht bzw. Isolierung der Myxomaviren durch Vermehrung auf der CAM bebrüteter Hühnereier und nachfolgender Adaptierung des Virus auf der CAM über weitere Passagen, vorzugsweise über weitere 2 Passagen. Alternativ kann für die Anzucht und/oder Adaptierung aber auch die Allantoisflüssigkeit bebrüteter Hühnereier verwendet werden.

Die eigentliche Attenuierung erfolgt dann durch Dauerpassagen auf einer oder mehreren permissiven Zellkulturen, bis eine Attenuierung bzw. der gewünschte Attenuierungsgrad des Virus erreicht ist. Dafür können zur Vermehrung des Virus zunächst verschiedene permissive Zellsysteme ausprobiert werden und anschließend ein oder mehrere Zellsysteme, in denen die höchsten Infektiositätstitel erzielt werden, für weitere Passagierungen ausgewählt werden. Für eine Attenuierung durch Dauerpassagen eignen sich sowohl primäre als auch sekundäre Zellkulturen wie auch permanente bzw. kontinuierliche Zelllinien. So kann eine Attenuierung durch Vermehrung in primären oder sekundären Hühnerembryofibroblasten-(FHE-) Kulturen oder in Kulturen permanenter FHE-Zellen erfolgen.

Erfindungsgemäß bevorzugt wird für die Attenuierung des Myxomavirus das Virus in einer permanenten Zellkultur, insbesondere einer Vero-Zellkultur, passagiert bzw. vermehrt,

bevorzugt über 80 bis 150 Passagen und besonders bevorzugt über 120 Passagen. Alternativ oder zusätzlich wird das Virus erfindungsgemäß auf einer binären, permanenten Zelllinie passagiert, wobei bevorzugt AVIVER-Zellen verwendet werden. Diese Zellen bzw. Zellkultur wurde durch eine Zellfusion zwischen Hühnerembryofibroblasten (FHE) und Vero-Affennierenzellen erhalten. Für die erfindungsgemäße Attenuierung des Myxomavirus werden vorzugsweise die isolierten und adaptierten Viren in einem ersten Schritt in Vero-Zellkulturen passagiert, die Viren anschließend in eine binäre AVIVER-Zellkultur überführt und in diesen vorzugsweise über 10 bis 50 Passagen, insbesondere über 20 bis 30 Passagen, und besonders bevorzugt über 25 Passagen vermehrt.

Anschließend kann das attenuierte Myxomavirus noch zusätzlich über weitere Attenuierungspassagen vermehrt werden. Eine Weitervermehrung der Viren erfolgt vorzugsweise über weitere Passagierung in Vero-Affennierenzellen, insbesondere über 100 bis 200 Passagen.

Ein besonders bevorzugter, weiterer Verfahrensschritt ist eine zusätzliche Inaktivierung des attenuierten Myxomavirus. Eine Inaktivierung kann durch chemische Behandlung, Bestrahlung, Hitze- oder pH-Einwirkung erfolgen, insbesondere durch eine chemische Behandlung mit Beta-Propiolacton. Durch die Behandlung der attenuierten Myxomaviren mit Beta-Propiolacton werden die paraspezifischen Aktivitäten noch gesteigert, während die nach der Attenuierung ggf. noch vorhandenen immunisierenden Eigenschaften verloren gehen.

Eine besonders bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens umfasst die folgenden Schritte:

- Isolieren von Myxomaviren aus infiziertem Gewebe eines typisch an einer generalisierten Myxomatose erkrankten Kaninchens durch Vermehrung auf der Chorioallantoismembran (CAM) bebrüteter Hühnereier und nachfolgender Adaptierung des Virus an die CAM über weitere 2 Passagen;

- Attenuieren der isolierten Viren durch Passagierung in Vero-Zellkulturen, vorzugsweise über 120 Passagen;

- Überführung der Viren in eine binäre AVIVER-Zellkultur, wobei die AVIVER-Zellen durch eine Zellfusion zwischen Hühnerembryofibroblasten (FHE)- und Vero-Affennierenzellen erhalten wurden, und Attenuierung des Virus in dieser Zellkultur über 10 bis 50, vorzugsweise 25, Passagen,



- nachfolgende Rückübertragung des Virus auf Vero-Affennierenzellen und Vermehren der Viren durch weitere Attenuierungspassagen in den Vero-Zellen, vorzugsweise über etwa 150 Passagen;

5 und wahlweise

- Inaktivieren der attenuierten Myxomaviren durch Behandlung mit Beta-Propiolacton, wobei durch diese Behandlung die paraspezifischen Aktivitäten gesteigert werden, während die nach der Attenuierung noch vorhandenen  
10 immunisierenden Eigenschaften verloren gehen.

Die Attenuierung durch Dauerpassage wird in der Regel durch 3 bis 5 Plaque-Endverdünnungen abgeschlossen. Nach Gewinnung und Austestung verschiedener Klone werden diejenigen Klone zur Weitervermehrung ausgewählt, mit denen die höchsten  
15 Infektiositätstiters erzielt und mit denen eine hohe paramunisierende Wirksamkeit – z.B. im VSV challenge Test in der Babymaus – nachgewiesen werden. Diese Vorgehensweise soll insbesondere für die Bereitstellung von genetisch einheitlichem Virusmaterial für die weitere Verwendung sorgen.

20 Der Ausdruck „Attenuierung“, wie er im Zusammenhang mit dieser Erfindung verwendet wird, bezeichnet die experimentelle Veränderung des ursprünglich virulenten Myxomavirus in die modifizierte Form, bei gleichzeitiger Steigerung der paramunisierenden Eigenschaften. Nachweisbar ist die Attenuierung durch eine oder mehrere der folgenden Eigenschaften:

- Verminderung bzw. Abschwächung oder Verlust der Virulenz für europäische Haus-  
25 und Wildkaninchen (Gattung *Oryctolagus cuniculus csp.*),
- Abschwächung oder Verlust der Kontagiosität,
- Einengung des Wirtsspektrums in Zellkulturen,
- Änderung der immunisierenden Eigenschaften
- Erwerb paramunisierender, kurzzeitig protektiver Aktivitäten.

30 Eine Attenuierung kann zu Deletionen im terminalen Bereich des Myxomavirusgenoms führen. Häufig wird mit zunehmendem Attenuierungsgrad eine zunehmende Anzahl von Deletionen im viralen Genom beobachtet.

Der Attenuierungsgrad kann im Laufe der Passagierungen durch entsprechende, geeignete  
35 Wirksamkeitstests, wie sie im Stand der Technik bekannt sind (vgl. z.B. US 6,805,870, Spalte 12, sowie die weiteren, dort zitierten Literaturhinweise) und durch Klonierung überprüft und kontrolliert werden.

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner attenuierte Myxomaviren, die durch das erfindungsgemäße Verfahren erhältlich sind, pharmazeutische Zusammensetzungen, die das attenuierte Myxomavirus bzw. den erfindungsgemäßen Myxomavirus-Monoparamunitätsinducer umfassen, sowie die Verwendung der Myxomavirus-Monoparamunitätsinducer zur Aktivierung des paraspezifischen Immunsystems in einem Säugetier bzw. die Verwendung des attenuierten Virus zur Herstellung eines entsprechenden Arzneimittels.

10 Aufgrund der überraschenden paramunisierenden Eigenschaften eignen sich die erfindungsgemäßen Myxomavirus-Monoparamunitätsinducer zur Behandlung und/oder zur Prophylaxe von Immunsystem-Dysfunktionen, Immunsuppression, Immunschwäche-Erkrankungen, Dysfunktionen der Homöostase zwischen Hormon-, Kreislauf-, Stoffwechsel- und Nervensystem, neonataler Infektionsbedrohung, Tumorerkrankungen, 15 Viruserkrankungen, bakteriellen Erkrankungen, therapieresistenten infektiösen Faktorenkrankheiten, viralen und bakteriellen Mischinfektionen, chronischen Manifestationen infektiöser Prozesse, Leberkrankheiten unterschiedlicher Genese, chronischen Hautkrankheiten, Herpeskrankheiten, chronischen Hepatitiden, grippalen Infekten, Endotoxinschäden.

20 Die erfindungsgemäßen Monoparamunitätsinducer sind generell unschädlich für die Umwelt und wirksam im Sinne einer Paramunisierung für Säugetiere, wie z.B. Mensch, Pferd, Hund, Katze, Schwein, für Vögel sowie auch für Reptilien, wie z.B. Echsen, Schlangen, Schildkröten. Sie sind daher für die Anwendung in der Human- und Veterinärmedizin 25 besonders gut geeignet.

Darüberhinaus weisen die erfindungsgemäßen Monoparamunitätsinducer eine sehr gute paramunisierende Wirksamkeit mit hoher Potenz auf. Sie sind mit dem erfindungsgemäßen Verfahren in geeigneter Weise herstellbar und sicher für die Anwendung im medizinischen 30 Bereich. Durch die Attenuierung der Myxomaviren nehmen die immunisierenden Eigenschaften der Myxomaviren ab, während die paraspezifischen Aktivitäten zunehmen. Die erfindungsgemäßen Monoparamunitätsinducer haben daher keine immunisierenden sondern paramunisierenden Eigenschaften, was eine mehrmalige und kontinuierliche Anwendung ermöglicht. Diese paramunisierenden Eigenschaften des Myxomavirus des 35 Kaninchens bzw. seiner paramunisierenden Viruskomponenten sind überraschend und waren nicht vorhersehbar.

Der Ausdruck „*Paramunisierung*“ wie er im Zusammenhang mit dieser Erfindung verwendet wird, bezeichnet die medikamentöse Aktivierung der zellulären Elemente des paraspezifischen Immunsystems und die damit verbundene Bildung bzw. Freisetzung von Zytokinen mit dem Ziel, Dysfunktionen zu beheben, den nichterreger- und nichtantigenspezifischen Schutz eines Individuums schnell zu erhöhen und regulatorisch zwischen Immun-, Hormon-, Nerven- und Gefäßsystem zu wirken. Eine Paramunisierung führt zum Schutzzustand der Paramunität.

Der Ausdruck „*Paramunität*“ wie er im Zusammenhang mit dieser Erfindung verwendet wird, bezeichnet den aktiv erworbenen Zustand eines optimal regulierten und funktionierenden paraspezifischen Abwehrsystems, verbunden mit einem schnell entstandenen, zeitlich limitierten Schutz gegenüber einer Vielzahl von Erregern, Antigenen und anderen Noxen. Die Phagozytoserate, die Funktion der NK-Zellen (natürliche Killerzellen) und die Aktivität sonstiger lymphoretikulärer Zellen (z.B. dendritischer Zellen) sind bis zum physiologischen Optimum erhöht.

Der Ausdruck „*Paramunitätsinducer*“ wie er im Zusammenhang mit dieser Erfindung verwendet wird, bezeichnet ein pyrogenfreies, nicht toxisches Arzneimittel, das dazu bestimmt ist, bei Mensch und Tier zur Erzeugung und Regulierung körpereigener Abwehr- und Schutzmechanismen im Sinne einer Paramunisierung angewendet zu werden.

Der Ausdruck „*Myxomavirus-Monoparamunitätsinducer*“ wie er im Zusammenhang mit dieser Erfindung verwendet wird, bezeichnet ein Arzneimittel das auf attenuierte Myxomaviren des Kaninchens bzw. einem attenuierten Myxomavirus-Stamm basiert, einschließlich der paramunisierenden Viruskomponenten und der Bestandteile davon, die in einem Organismus, bevorzugt in einem Säugetier (z.B. Mensch), den Zustand der Paramunität erzeugen.

Der Ausdruck „*Myxomavirus*“ wie er im Zusammenhang mit dieser Erfindung verwendet wird, bezeichnet die Spezies des Myxomatosevirus des Genus *Leporipoxvirus*. Das Myxomavirus gehört zur Unterfamilie der *Chordopoxviridae* und zur Familie der *Poxviridae* (Pockenviren).

Unter dem Begriff „*paramunisierende Viruskomponenten*“ wie er im Zusammenhang mit dieser Erfindung verwendet wird, werden eine Vielzahl von viralen Strukturen, die von einem Myxomavirus mit paramunisierenden Eigenschaften abgeleitet sind umfasst, beispielsweise vermehrungsfähige oder inaktivierte frisch isolierte Myxomaviren, vermehrungsfähige oder inaktivierte rekombinante Myxomaviren, die sich von frisch isolierten Myxomaviren ableiten,

Virushüllen, die abgetrennten Hüllen sowie Spaltprodukte und aberrante Formen dieser Hüllen, einzelne native oder rekombinante Polypeptide oder Proteine, insbesondere Membran- und Oberflächenrezeptoren, die in frisch isolierten Myxomaviren vorkommen oder von einem genetisch modifizierten Myxomavirus oder einem Teil seiner genetischen Information rekombinant exprimiert werden.

In den Tabellen 1 bis 4 sind die klinischen Ergebnisse mit dem Myxomavirus-Monoparamunitätsinducer PIND-MYXO basierend auf dem attenuierten Myxomatose-Zellkulturvirus, Stamm M-2, beim Menschen zusammengestellt.

Tabelle 1 zeigt die klinischen Ergebnisse bei der prophylaktischen Anwendung des Myxomavirus-Monoparamunitätsinducer PIND-MYXO beim Menschen.

Tabelle 2 zeigt die klinischen Ergebnisse bei der therapeutischen Anwendung des Myxomavirus-Monoparamunitätsinducer PIND-MYXO beim Menschen.

Tabelle 3 zeigt die Wirkung einer Paramunisierung mit Myxomavirus-Monoparamunitätsinducer (PIND-MYXO) bei Patienten mit niedrigen Immunparametern (7 Tage nach PIND-MYXO-Applikation)

Tabelle 4 zeigt die Wirkung einer Paramunisierung mit Myxomavirus-Monoparamunitätsinducer (PIND-MYXO) bei Patienten mit erhöhten Immunparametern (7 Tage nach PIND-MYXO-Applikation)

Die Erfindung basiert auf den überraschenden Befund, dass attenuierte Myxomaviren des Kaninchens oder deren paramunisierenden Bestandteile in der Lage sind, sehr gute paramunisierende Eigenschaften in einem Empfängerorganismus hervorzurufen, die zum Schutzzustand der Paramunität führen. Grundlage für diese Erfindung war die erstmals gelungene Attenuierung von Myxomaviren des Kaninchens in Zellkulturen.

Vorzugsweise basieren die erfindungsgemäßen Monoparamunitätsinducer auf lyophilisierten, attenuierten und inaktivierten Myxomaviren des Kaninchens oder deren paramunisierenden Viruskomponenten. Vorzugsweise stammen die erfindungsgemäßen attenuierten Myxomaviren oder deren Viruskomponenten von einem Myxomavirus-Stamm oder mehreren unterschiedlichen attenuierten Myxomavirus-Stämmen. Es ist dabei bevorzugt, dass die erfindungsgemäßen Monoparamunitätsinducer Kombinationen von

einem oder mehreren Myxomavirusstämmen oder deren paramunisierenden Viruskomponenten umfassen.

Die paramunisierenden Eigenschaften, welche durch die Applikation von Myxomavirus-Monoparamunitätsinducer in einem Säugetier, wie zum Beispiel beim Menschen, hervorgerufen werden, sind besonders nützlich zur Beseitigung von Dysfunktionen, zur Erhöhung des nichtantigenspezifischen Schutzes eines Individuums, zur Beseitigung einer durch Stressfolgen oder anderweitig (z.B. medikamentös) entstandenen Immunsuppression oder Immunschwäche und um regulatorisch zwischen dem Immun-, Hormon- und Gefäßsystem zu wirken.

Die Erfindung basiert ferner auf einer gelungenen Attenuierung eines Myxomavirus-Stammes durch Passagierung über Zellkulturen, wobei die virulenten und/oder immunisierenden Eigenschaften des Myxomavirus-Stammes vermindert werden bzw. verloren gehen. Eine zusätzliche Inaktivierung der Myxomaviren kann desweiteren durch Bestrahlung, Hitze- oder pH-Einwirkung erfolgen oder, besonders bevorzugt, durch eine chemische Behandlung mit Beta-Propiolacton. Die Monoparamunitätsinducer basieren auf attenuierten, lyophilisierten Myxomaviren, wobei auch einzelne Viruskomponenten eines Myxomavirus, die geeignet sind, paramunisierende Aktivitäten in einem Organismus hervorzurufen, von der Erfindung umfasst sind.

Im Folgenden soll eine Ausführungsform des erfindungsgemäßen Herstellungsverfahrens der Monoparamunitätsinducer auf der Basis eines isolierten und attenuierten Myxomavirus-Stammes des Kaninchens über Zellkulturpassagierung dargestellt werden. Das Herstellungsverfahren ist hierbei nicht auf diesen bevorzugten Stamm beschränkt, sondern gleichermaßen auf andere Myxomavirus-Stämme des Kaninchens übertragbar. Auch umfasst von der vorliegende Erfindung sind rekombinante Formen eines Myxomavirus-Stammes, die mittels genetischer Modifikation hergestellt worden sind. Bevorzugt sind hierbei rekombinante Myxomavirus-Stämme, bei denen ein oder mehrere Abschnitte im Genom, welche für Zytokin-Rezeptoren kodieren, durch eine Modifikation in Form einer Addition, Substitution oder Deletion modifiziert wurden, wobei durch die Modifikation die Rezeptoreigenschaften des Zytokin-Rezeptors verloren geht. Vorzugsweise sind dies die Genabschnitte, die für die Rezeptoren für Interferone (IFN), Interleukine (IL) und Tumornekrosefaktoren (TFN) kodieren, insbesondere für IFN- $\alpha$ -R, IFN $\gamma$ -R, TNF-R, IL-1-R, IL-2-R, IL-6-R und IL-12-R.

Weiterhin sollen die hier angegebenen Zahlenwerte bezüglich der Inkubationsdauer oder der Passagierzahl über Zellkulturen nicht als beschränkend aufgefasst werden. Geringfügige Modifikationen dieser Parameter und Modifikationen, die für den Fachmann ersichtlich sind und auch zur einer Präparation von attenuierten Myxomaviren führen, sind von dieser Erfindung gleichermaßen umfasst.

Eine bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft die gelungene Attenuierung des Myxomavirus-Stammes M-2. Der Myxomavirus-Stamm M-2 wurde aus europäischen Wildkaninchen, die an Myxomatose erkrankt waren, isoliert (Herrlich A., Mayr A. und Munz E.: „Die Pocken“, 2. Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1967). Die veränderten Hautzellen, die aus dem Unterhautgewebe des erkrankten Kaninchens gewonnen worden sind, werden nach Aufschluss auf die Chorioallantoismembran (CAM) von vorzugsweise 10-12 Tage lang bebrüteter Hühnereier geimpft. Die Myxomaviren werden über 2 bis 6 Passagen, vorzugsweise über drei Passagen, auf der Chorioallantoismembran weiter vermehrt bzw. adaptiert (CAM-Passagen; Verfahren siehe Herrlich A., Mayr A. und Munz E.: „Die Pocken“, 2. Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1967). Die 2. bis 6. Passage, vorzugsweise die dritte CAM-Passage, dient als Ausgangsmaterial für die weitere Attenuierung des Myxomavirus in Zellkulturen. Die Attenuierung erfolgt nach Adaptierung der Viren in der Chorioallantoismembran (erkennbar durch typische Herde auf der Chorioallantoismembran) in 3 Stufen. In Stufe 1 werden 80 bis 150, vorzugsweise 120 kontinuierliche sogenannte Endverdünnungs-Passagen in Vero-Zellen durchlaufen (Vero-Zellen, ATCC CCL-81). Nach Durchlaufen dieser Passagen ist das Myxomavirus in seiner Virulenz abgeschwächt.

In einer 2. Stufe wird nach der 80. bis 150. Passage, vorzugsweise nach der 120. Passage in Vero-Zellen, die Virussuspension auf sogenannte AVIVER-Zellen übertragen und über 10 bis 50 Passagen, vorzugsweise über 20 bis 30, insbesondere über 25 Passagen, weitergeführt. AVIVER-Zellen werden durch Zellfusion zwischen Hühnerembryofibroblasten (FHE)- und Vero-Zellen gewonnen und werden als binäre permanente Zellkultur bezeichnet.

Die letzte Passage über AVIVER-Zellen, vorzugsweise die 25. Passage, wird auf Vero-Zellen zurückübertragen und wird in der 3. Stufe der Attenuierung für weitere 100 bis 200 Passagen, vorzugsweise etwa 157 Passagen, in Vero-Zellen weitergeführt. Auf diese Weise wird das Myxomavirus über insgesamt mehr als 300 Zellkulturpassagen vermehrt. Nach der 3. Stufe der Vermehrung des Myxomavirus in Zellkulturen ist das Myxomavirus ausreichend attenuiert.

Für die Anzucht der VERO-Zellkulturen und der AVIVER-Zellen wird vorzugsweise ein vollsynthetisches Medium verwendet, besonders bevorzugt ist das Medium MEM („minimal essential medium“) plus 5 bis 20%, vorzugsweise 10% BMS (Serumersatzmedium) und 5 bis 20, vorzugsweise 10% Lactalbuminhydrolysat. Als Virusmedium wird nach dem Austausch mit dem Anzuchtmedium, vorzugsweise MEM-Medium, mit 5 bis 20%, vorzugsweise mit 10% Lactalbuminhydrolysat, ohne BMS bzw. ohne fetalem Kälberserum und ohne Antibiotika verwendet. Sämtliche Herstellungsverfahren werden vorzugsweise bei pH-Werten von 7.0 bis 8.0, vorzugsweise bei einem pH-Wert von 7,25 durchgeführt. Virusernten mit Titer von  $10^{5.0}$  bis  $10^{7.5}$ , vorzugsweise von mindestens  $10^{6.5}$  TCID<sub>50</sub>/ml (TCID<sub>50</sub> = 50% tissue culture infectious dose), sind bevorzugt als Ausgangsmaterial für die Herstellung des erfindungsgemäßen Monoparamunitätsinducers PIND-MYXO geeignet.

Die Vermehrung des Myxomavirus führt in VERO-Zellen zu einem typischen cytopathischen Effekt (cpE), der schließlich durch eine Zerstörung der infizierten Zellen (Lyse) charakterisiert ist. Bei einer Animpfdosis von ca. 10 MOI („multiplicity of infection“) kommt es nach einer kurzen Abkugelungsphase (1-2 Tage) für etwa 3 Tage zu netzartigen Zellstrukturen und nach etwa 5 Tagen zur Lyse der Zellen. Die 301. Passage in VERO-Zellen hatte einen Infektionstiter von etwa  $10^{6.5}$  TCID<sub>50</sub>/ml.

Für die Inaktivierung des attenuierten Myxomavirus wird eine chemische Behandlung mit Beta-Propiolacton bei einer Konzentration von 0,01-1% Beta-Propiolacton, vorzugsweise bei einer Konzentration von 0,05% Beta-Propiolacton durchgeführt. Diese Inaktivierung führt zu einem vollständigen Verlust der ggf. noch vorhandenen immunisierenden Eigenschaften, wobei die paraspezifischen Aktivitäten nicht nur erhalten bleiben, sondern sogar signifikant ansteigen.

Zur weiteren Verarbeitung der attenuierten und inaktivierten Myxomaviren zu einem Myxomavirus-Monoparamunitätsinducer (PIND-MYXO) sollte das zur Virusinaktivierung benutzte Virusausgangsmaterial einen Virustiter von etwa  $10^{5.0}$  bis  $10^{7.0}$ , vorzugsweise von mindestens  $10^{6.5}$  TCID<sub>50</sub>/ml, haben.

Die Reinigung erfolgt vorzugsweise mittels Zentrifugation bei niedriger Umdrehungszahl (z.B. 1000 UpM). Nach der Zentrifugation wird 0,5-10% succinylierte Gelatine (z.B. Polygeline, z.B. Firma Hausmann, St. Gallen/Schweiz), vorzugsweise 5% succinylierte Gelatine zugesetzt. Das resultierende Gemisch kann anschließend in Portionen von 1.5 ml in entsprechenden sterilen Glasfläschchen oder Ampullen lyophilisiert und bei Bedarf mit destilliertem Wasser (Aqua dest.) aufgelöst werden. Ein Volumen von 0,5-2 ml,

vorzugsweise von 1,0 ml des mit Aqua dest. aufgelösten Lyophilisats entspricht einer Impfdosis für den Menschen bei intramuskulärer Applikation (siehe auch Mayr A. und Mayr. B.: „Von der Empirie zur Wissenschaft“, Tierärztl. Umschau, Aufl. 57: 583-587, 2002).

- 5 Klinisch kann die Attenuierung durch den Verlust der Virulenz für europäische Haus- und Wildkaninchen (Gattung *Oryctolagus cuniculus* csp.), durch einen Verlust der Kontagiosität, durch eine nahezu vollständige Einengung des Wirtsspektrums in Zellkulturen und durch die Änderung der immunisierenden Eigenschaften nachgewiesen werden.
- 10 Das lyophilisierte Präparat kann bei Temperaturen von vorzugsweise etwa +4°C oder bei geringeren Temperaturen, vorzugsweise etwa -60°C, zeitlich unbegrenzt stabil gelagert werden.

- Durch gentechnologische Untersuchungen der präparierten attenuierten Myxomaviren wurde
- 15 nachgewiesen, dass es im Myxomavirus-Genom zu multiplen Deletionen gekommen war. Im Falle des Ausgangsstammes M-2 besteht das Myxomavirusgenom aus einer einzelnen linearen Desoxyribonukleinsäure (DNA) mit einer Länge von insgesamt etwa 160 Kilobasen (kB), die für mehrere hundert Proteine kodiert (Herrlich A., Mayr A. und Munz E.: „Die Pocken“, 2. Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1967). Die Sequenzen der terminal
- 20 gelegenen „Inverted Repeats“ (engl.: "terminal inverted repeats", TIR) liegen bei etwa 11 kB des Genomabschnitts (McFadden, G. and Graham, K.: „Modulation of cytokine networks by poxvirus“, Virology, Aufl. 5: 421-429, 1994).

- So wurde festgestellt, dass es durch die Attenuierung der Myxomaviren über kontinuierliche
- 25 Vero-Zell-Passagen zu einem Verlust der kodierenden Genabschnitte für die Rezeptoren für Interferon  $\alpha$  und  $\gamma$  (IFN  $\alpha$ , IFN $\gamma$ ), für den Tumornekrosefaktor (TNF) und für die Interleukine (IL-) 1, 2, 6 und 12 gekommen ist. Interessanterweise zählen diese Zytokine zu den paraspezifischen Abwehrfaktoren des unspezifischen Immunsystems. Durch Bindung an die entsprechenden Virus-Rezeptoren werden die Zytokine neutralisiert, so dass sich das Virus
- 30 ungehemmt vermehren kann. Die Deletionen von Genabschnitten, die für die oben genannten Zytokin-Rezeptoren kodieren, betreffen hauptsächlich die terminalen Bereiche der DNA. Daneben konnte man aber auch im konservierten Teil der DNA Deletionen nachweisen, die während den AVIVER-Zellpassagen entstanden sind. Diese Deletionen betreffen zwei Gene, die für ein Immunepitop und Virulenzgen kodieren. Vermutlich sind
- 35 solche genetische Modifikationen mit ein Grund für die Abnahme der immunisierenden, d.h. antigenspezifischen Aktivitäten und die gleichzeitige Zunahme der paraspezifischen Aktivitäten des attenuierten Myxomavirus.



Die immunisierenden Epitope und die paraspezifischen bzw. unspezifischen Epitope sind konkurrierend. Deshalb führt eine Abnahme der erstgenannten Peptide oder Proteine zu einem Anstieg der Wirkung der paraspezifischen Aktivitäten. Reste immunisierender und virulenzsteigernder Proteine werden bei der Präparation von Monoparamunitätsinducern durch das oben beschriebene Verfahren zur Inaktivierung der attenuierten Myxomaviren beseitigt.

Der erfindungsgemäße Monoparamunitätsinducer, auch PIND-MYXO genannt, basiert auf der Verwendung von attenuierten Myxomaviren oder deren paramunisierenden Bestandteilen und ist aufgrund seiner paramunisierenden Eigenschaften für folgende prophylaktische oder therapeutische Indikationen bei einem Patienten geeignet:

- Infektiöse Faktorenkrankheiten und Mischinfektionen, chronische Manifestationen infektiöser Prozesse, hartnäckig rezidivierende Infektionen und chemotherapieresistente, bakterielle und virale Infektionen

- Abwehrschwächen beziehungsweise Dysregulationen im Abwehrsystem eines Organismus

- neonatale Infektionsbedrohung

- adjuvante Therapie bei bestimmten Tumorkrankheiten, z.B. Verhütung der Metastasierung, Minderung von Nebenwirkungen durch Chemo- und Strahlentherapie

- Regulierung der Homöostase zwischen Hormon-, Kreislauf-, Stoffwechsel- und Nervensystem.

Die erfindungsgemäßen Paramunitätsinducer können Säugetieren, einschließlich dem Menschen, Vögeln und Reptilien parenteral oder lokal verabreicht werden. Die lokale Verabreichung von Paramunitätsinducern stimuliert speziell die paraspezifischen Abwehrmechanismen in den Schleimhäuten und in der Haut. Daneben kommt es aber auch zu einer gewissen systemischen Wirkung. Dagegen beeinflussen parenteral angewendete Paramunisierungen die lokalen Abwehrmechanismen in der Haut und der Schleimhaut kaum, wobei sie bevorzugt systemisch wirken.

Nebenwirkungen traten selbst bei zahlreichen, kontinuierlich durchgeführten, parenteralen Applikationen bei Mensch und Tier nicht auf. Für den Einsatz von PIND-MYXO gelten die

gleichen Indikationen beim Tier wie beim Menschen. Zugleich empfiehlt es sich, in Problembetrieben, speziell bei Haltungen von Pferden, Schweinen, Hunden und Katzen, die Neugeborenen sofort am Tage der Geburt und vorzugsweise am 1. und eventuell auch 2. Tag nach der Geburt zu paramunisieren. Die Einzeldosis beträgt etwa 0,5 bis 5 ml des aufgelösten Lyophilisats, bei Pferd und Schwein beträgt die Einzeldosis vorzugsweise 2 ml und bei Hund und Katze vorzugsweise 0,5 ml bei parenteraler Applikation. Erfindungsgemäß empfiehlt es sich, zur Vermeidung von Nebenreaktionen und zur Unterstützung der Immunisierung bei der Verabreichung von Impfstoffen PIND-MYXO einen Tag vor und/oder gleichzeitig mit spezifischen Schutzimpfungen parenteral zu verabreichen.

Eine Ausführungsform der Erfindung betrifft die Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur lokalen Applikation für die Induktion der Paramunität in Haut und Schleimhäuten. Vorzugsweise betrifft die pharmazeutische Zusammensetzung eine Buccal- oder Lutschtablette basierend auf Bestandteilen eines attenuierten und inaktivierten Myxoma-Zellkulturvirus. Die erfindungsgemäßen Buccal-Tabletten werden bevorzugt unter Zusatz von Sorbit, Polyethylenglykol 6,00, Kaliumhydrogenphosphat, Tyrospirol-Tablettenessenz, Kollidon 25 und Magnesiumstearat hergestellt. PIND-MYXO kann aber auch nasal, rektal oder vaginal mit geeigneten Trägern verabreicht werden.

Die nachfolgenden Beispiele sind bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung und dienen der weiteren Erläuterung des Erfindungsgegenstandes.

#### Beispiel 1

Als Ausgangsmaterial zur Herstellung des erfindungsgemäßen Monoparamunitätsinducers PIND-MYXO wurde aus der ödematösen Subkutis eines in typischer Weise an Myxomatose erkrankten europäischen Wildkaninchens (Gattung *Oryctolagus*) das Myxomavirus über die Anzüchtung auf der Chorioallantoismembran (CAM) 10 Tage bebrüteter Hühnereier (VALO-Eier) isoliert und dreimal nach dem Verfahren von Herrlich *et al.* auf der CAM in Passagen adaptiert (Herrlich A., Mayr A. und Munz E.: „Die Pocken“, 2. Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1967). Die dritte CAM-Passage wurde in einer 1. Stufe auf VERO-Zellen über 120 Passagen (ATCC CCL-81, WHO, American Type Culture Collection) adaptiert, in einer 2. Stufe durch 24 Zwischenpassagen in AVIVER-Zellkulturen vermehrt und in der 3. Phase in VERO-Zellen weitergezüchtet. Insgesamt sind etwa 300 Passagen mit dem Ziel der Attenuierung durchgeführt worden. Nach diesen kontinuierlichen Endverdünnungspassagen war das ursprünglich virulente Myxomavirus attenuiert.

Das attenuierte Myxomavirus wird in Vero-Zellen vermehrt. Für die Anzucht der Vero-Zellkulturen wird ein vollsynthetisches Medium, bestehend aus MEM („minimal essential medium“) plus 10% BMS (Serumersatzmedium) und 10% Lactalbuminhydrolysat verwendet. Als Virusmedium wird nach dem Austausch mit dem Anzuchtmedium nur MEM mit 10%  
5 Lactalbuminhydrolysat ohne BMS bzw. ohne fetales Kälberserum und ohne Antibiotika verwendet. Sämtliche Herstellungsverfahren werden bei pH-Werten von über 7,25 durchgeführt. Virusernten mit Titer über  $10^{6.5}$  TCID<sub>50</sub>/ml dienen als Ausgangsmaterial für die Herstellung des erfindungsgemäßen Monoparamunitätsinducers PIND-MYXO. Nach Inaktivierung der Virusernten mit 0,05% Beta-Propiolacton und grobtouriger Zentrifugation,  
10 wird dem Virusmaterial 5% succinylierte Gelatine (Polygeline) vor der Lyophilisierung zugesetzt.

Das lyophilisierte Präparat hält sich bei Zimmertemperaturen wie auch bei Temperaturen von etwa 4°C bis -80° C und ist vorzugsweise bei etwa 4°C oder auch etwa -60°C zeitlich  
15 unbeschränkt haltbar. Ein Volumen von 1 ml des in sterilem Aqua dest. aufgelösten Lyophilisats entspricht einer Impfdosis. Die Applikation erfolgt tief intramuskulär bzw. lokal (siehe Beispiele 3, 4 und 5).

#### Beispiel 2

20 In analoger Weise wie in Beispiel 1 beschrieben, wird der erfindungsgemäße PIND-MYXO-Inducer in trockener Form (Lyophilisat nicht aufgelöst) lokal auf die Schleimhäute des oberen Respirationstrakts, bevorzugt nasal, dreimal am Tag zur Prophylaxe bzw. Therapie (je 1 ml pro Applikation) von multifaktoriellen Infektionen (z.B. grippale Infekte) appliziert.

#### Beispiel 3

25 In analoger Weise wird der wie in Beispiel 1 hergestellte PIND-MYXO-Inducer in flüssiger Form erfindungsgemäß kutan zur besseren Durchblutung der Haut, zur schnelleren Abheilung von Wunden sowie zur Behandlung von Krampfadern bzw. chronisch-venösen Insuffizienzen (Ulcus cruris) beim Menschen eingerieben. Das Lyophilisat kann zu diesem Zweck zum Beispiel in Fettcreme (z.B. Bepanthen, Linola-Fett) aufgenommen werden, wobei der pH-Wert leicht alkalisch sein sollte. Diese Zubereitung sollte für jede Anwendung frisch hergestellt werden. Die Applikation wird mehrmals am Tage durch manuelles Einreiben der  
30 unverletzten Haut vorgenommen. Offene Wunden können durch Aufträufeln des frisch gelösten Präparates auf die Wundbereiche behandelt werden. Die Behandlung sollte täglich bis zur Heilung erfolgen.

## Beispiel 4

5 Analog wird der wie in Beispiel 1 hergestellte Monoparamunitätsinducer PIND-MYXO zur Vermeidung von Nebenreaktionen und zur Verbesserung des Impferfolges einen Tag vor und gleichzeitig bei einer Schutzimpfung mit klassischen, spezifischen Vaccinen parenteral verabreicht.

## Beispiel 5

10

Analog wird der wie in Beispiel 1 hergestellte Monoparamunitätsinducer PIND-MYXO zu Buccal- bzw. Lutschtabletten verarbeitet. Die Herstellung und Verwendung der Lutschtabletten für die lokale Paramunisierung der Hals-Nasen-Ohren- und Mundschleimhäute ist neu und Bestandteil der Erfindung. Über die aktivierten  
15 Mundschleimhäute kommt es nicht nur zu einem "homing"-Effekt (Auswandern von Abwehrzellen in Schleimhäute anderer Organsysteme), sondern auch zu einer partiellen parenteralen Paramunisierung. Für die Herstellung der Buccal- bzw. Lutschtabletten hat sich folgendes Herstellungsverfahren bewährt:

20 Dem flüssigen Inducermaterial wird zur Lyophilisierung an Stelle von Gelatine, 5% Kollidon 25 (Polyvinylpyrrolidon) zugesetzt. Zur Herstellung der fertigen Tablette benötigt man Harnstoff, Sorbit, Polyethylenglykol 6000 und Magnesiumstearat. Als Rezeptur für eine Tablette mit einem Gewicht von 500,5 mg Gewicht wird empfohlen:

PIND-MYXO-Lyophilisat	65 mg
Harnstoff	50 mg
Sorbit	267 mg
Polyethylenglykol 6000	118 mg
Magnesiumstearat	<u>0,5 mg</u>
Tablettengewicht	500,5 mg

25

Pro Tag sollten zur Erzielung einer optimalen Paramunisierung 4-6 Tabletten von dem Patienten in regelmäßigen Abständen eingenommen werden.

30 Folgende Rezeptur einer pharmazeutischen Zusammensetzung hat sich für die Herstellung von Buccal-Tabletten bewährt:

PIND-MYXO-Lyophilisat	115 mg
Sorbit	360 mg
Polyethylenglykol 6000	300 mg
Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), wasserfrei	2 mg
Dinatriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), wasserfrei	8 mg
Tyrospirol-Essenz-Tabletten	0,8 mg
Magnesiumstearat	<u>20 mg</u>
Tablettengewicht	805,8 mg

Die Tabletten lösen sich im Mund des Patienten langsam auf und können nach der Auflösung geschluckt werden.

5

Die in den Tabellen 1 bis 4 zusammengestellten klinischen Versuchsergebnisse mit dem erfindungsgemäßen Monoparamunitätsinducer, basierend auf dem Lyophilisat des Myxomavirus-Stammes M-2, demonstrieren die sehr guten paramunisierenden Aktivitäten von Myxomaviruslyophilisaten beim Menschen. Diese Daten sind gleichermaßen auf andere

10

Säugetiere wie auch auf Vögel und Reptilien übertragbar.

Tabelle 1:

**Klinische Ergebnisse mit einem Monoparamunitätsinducer aus attenuiertem Myxoma-Zellkulturvirus beim Menschen**  
**- prophylaktische Anwendungen -**  
**(lyophilisierter Inducer 1 OP (1 ml) intramuskulär)**

5

Indikationen	bewährte Applikationsmethoden
Zeiten mit starkem Infektionsdruck Stress Reisen, Prüfungen und ähnliche Belastungen vor bzw. gleichzeitig mit Schutzimpfungen	2 Injektionen vor der Belastung im Abstand von 24 Stunden
Chemotherapie, Bestrahlung (Minderung bzw. Verhinderung von Nebenreaktionen) Operationen (Verbesserung der Wundheilung)	1 Injektion täglich oder jeden 2. Tag bis zum Abschluss der Behandlung bzw. bis zur Genesung
Aufrechterhaltung einer optimalen Abwehr bzw. Homöodynamik  Vorsorge gegen Krebs und Hepatitiden  Verbesserung des Wohlbefindens	pro Monat 1-2 Injektionen im Abstand von 24 Stunden

Tabelle 2:

**Klinische Ergebnisse mit einem Monoparamunitätsinducer aus attenuiertem Myxoma-Zellkulturvirus beim Menschen**  
**- therapeutische Anwendung -**  
**(lyophilisierter Inducer 1 OP (1 ml) intramuskulär)**

Indikationen	bewährte Applikationsmethoden
Herpeskrankheiten (Zoster, infektiöse Mononukleose, Herpes simplex, usw.)	täglich 1 Injektion über 3-5 Tage bzw. bis zum Abklingen der Symptome; anschließend jeden 2. bzw. 3. Tag 1 Injektion bis zur völligen Genesung
chronische Hepatitiden	pro Monat eine "Kur": 3 Injektionen im Abstand von jeweils 24 Stunden
grippale Infekte virale sowie bakterielle Mischinfektionen (in Kombination mit Antibiotika- bzw. Chemotherapie)	1 Applikation pro Tag bis zum Abklingen der Symptome, anschließend 1 Injektion jeden 2. Tag bis zur völligen Genesung
Immunschwächen und Dysregulation der Abwehrsysteme (z.B. während bzw. nach Chemotherapie)	1. Intensivbehandlung über 5-10 Tage: 1 Injektion pro Tag 2. anschließend 2 Injektionen pro Woche im Abstand von 24 Stunden (Behandlung über längeren Zeitraum möglich)
Endotoxinschäden	täglich 1 Injektion über 7 Tage bzw. bis zur Genesung

Tabelle 3:

**Wirkung einer Paramunisierung mit Myxoma-Inducer (PIND-MYXO) bei Patienten mit niedrigen Immunparametern (7 Tage nach PIND-Myxo-Applikation)**

Patient	Patienten-Daten Diagnose/Therapie	Parameter (Normbereich)	Tag 0	Tag 7
A.S. weibl., 52 Jahre	Immunsuppression	Leukozyten (4000-10000/ $\mu$ l)	4000	9400
D.B. weibl., 54 Jahre	Colitis ulcerosa Cortisontherapie	Lymphozyten (900-3000/ $\mu$ l) CD4-Zellen (500-1800/ $\mu$ l) CD8-Zellen (100-1000/ $\mu$ l)	620 400 80	1360 920 210
U.S. männl., 38 Jahre	Immunstörung	Leukozyten (4000-10000/ $\mu$ l)	3800	7400
S.C. männl., 43 Jahre	mestastasierendes Prostata-CA Radiotherapie	Leukozyten (4000-10000/ $\mu$ l)	3800	9900
B.M. weibl., 56 Jahre	Infektanfälligkeit	zytotoxische Zellen (30-360/ $\mu$ l)	0	248



Tabelle 4:

**Wirkung einer Paramunisierung mit Myxo-Inducer (PIND-MYXO) bei Patienten mit erhöhten Immunparametern (7 Tage nach PIND-MYXO-Applikation)**

Patient	Diagnose/Therapie	Parameter (Normbereich)	Tag 0	Tag 7
G.P., weibl., 59 Jahre	Cervix-, Mamma- CA, Infektanfälligkeit	Leukozyten (4000-10000/ $\mu$ l) Granulozyten (2400-6400/ $\mu$ l)	12600 8420	8600 5930
C.H. weibl., 51 Jahre	Psychosomatisches Syndrom, Adipositas	Leukozyten (4000-10000/ $\mu$ l) Granulozyten (2400-6400/ $\mu$ l)	12700 9270	6000 4760

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts BN55PCT	Internationales Aktenzeichen
--	------------------------------

**ANGABEN ZU EINEM HINTERLEGTEM MIKROORGANISMUS  
ODER ANDEREM BIOLOGISCHEN MATERIAL**

(Regel 13<sup>bis</sup> PCT)

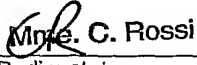
<b>A.</b> Die nachstehenden Angaben betreffen den hinterlegten Mikroorganismus oder anderes biologisches Material, das in der Beschreibung genannt ist auf Seite 5 , Zeile <b>22-27</b> .
---

<b>B. KENNZEICHNUNG DER HINTERLEGUNG</b>	Weitere Hinterlegungen sind auf einem zusätzlichen Blatt gekennzeichnet <input type="checkbox"/>
Name der Hinterlegungsstelle European Collection of Cell Cultures (ECACC)	
Anschrift der Hinterlegungsstelle (einschließlich Postleitzahl und Land) Porton Down Salisbury SP4 0JG Wiltshire Great Britain	
Datum der Hinterlegung 18. Dezember 2003	Eingangsnummer 03121801

<b>C. WEITERE ANGABEN</b> (falls nicht zutreffend, bitte frei lassen)	Die Angaben werden auf einem gesonderten Blatt fortgesetzt <input type="checkbox"/>
In Bezug auf alle Bestimmungsstaaten, für die eine solche Erklärung möglich ist, wird beantragt, insoweit dies rechtlich nach den Gesetzen des Bestimmungsstaates möglich ist, dass eine Probe des hinterlegten Mikroorganismus nur an einen unabhängigen Sachverständigen ausgehändigt wird, in Übereinstimmung mit der jeweiligen Patentgesetzgebung, z.B. EPÜ Regel 28(4); UK Patent Rules 1995, Schedule 2, Paragraph 3, Australian Regulation 3.25 (3); Dänische Patentgesetz Abschnitte 22 und 33(3) und entsprechenden Regelungen anderer Bestimmungsstaaten.	

<b>D. BESTIMMUNGSSTAATEN, FÜR DIE ANGABEN GEMACHT WERDEN</b> (falls die Angaben nicht für alle Bestimmungsstaaten gelten)

<b>E. NACHREICHUNG VON ANGABEN</b> (falls nicht zutreffend, bitte freilassen)
Die nachstehenden Angaben werden später beim Internationalen Büro eingereicht (bitte Art der Angaben nennen, z.B. „Eingangsnummer der Hinterlegung“)

Nur zur Verwendung im Anmeldeamt
<input checked="" type="checkbox"/> Dieses Blatt ist eingegangen mit der internationalen Anmeldung
 Bevollmächtigter Bediensteter

Nur zur Verwendung im Internationalen Büro
<input type="checkbox"/> Dieses Blatt ist beim Internationalen Büro eingegangen am:
Bevollmächtigter Bediensteter

### PATENTANSPRÜCHE

1. Monoparamunitätsinducer auf der Basis von paramunisierenden Viren oder Viruskomponenten, dadurch gekennzeichnet, dass die Viren oder Viruskomponenten von einem attenuierten Myxomavirus-Stamm des Kaninchens stammen.
2. Monoparamunitätsinducer nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der attenuierte Myxomavirus-Stamm eine Modifikation in Form einer Addition, Substitution oder Deletion in einem oder mehreren Genabschnitten, kodierend für die Bildung von Zytokin-Rezeptoren, aufweist, wobei durch die Modifikation die Rezeptoreigenschaften des Zytokin-Rezeptors verloren geht.
3. Monoparamunitätsinducer nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Zytokin-Rezeptoren ausgewählt sind aus der Gruppe von Rezeptoren für Interferone (IFN), Interleukine (IL) und Tumornekrosefaktor (TNF).
4. Monoparamunitätsinducer nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Zytokin-Rezeptoren ausgewählt sind aus der Gruppe von Rezeptoren für IFN $\alpha$ -R, IFN $\gamma$ -R, TNF-R, IL-1-R, IL-2-R, IL-6-R, IL-12-R.
5. Monoparamunitätsinducer nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Viruskomponenten Virushüllen oder aberrante Formen von Virushüllen eines attenuierten Myxomavirus-Stammes umfassen.
6. Monoparamunitätsinducer nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass der Myxomavirus-Stamm ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus M2, M7, Lausanne, Aust/Uriarra/Verg-86/1.
7. Monoparamunitätsinducer nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem Myxomavirus-Stamm um den Stamm M-2 mit der Hinterlegungsnummer ECACC 03121801 handelt.
8. Monoparamunitätsinducer nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass der Myxomavirus-Stamm in Zellkulturen attenuiert wurde.

9. Monoparamunitätsinducer nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den Zellkulturen um Vero-Affennierenzellen und/oder AVIVER-Zellen handelt.
10. Monoparamunitätsinducer nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die attenuierten Myxomaviren inaktiviert wurden.
11. Monoparamunitätsinducer nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass die attenuierten Myxomaviren mit Beta-Propiolacton inaktiviert wurden.
12. Monoparamunitätsinducer nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Konzentration von Beta-Propiolacton 0,01-1 % beträgt.
13. Monoparamunitätsinducer nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Konzentration von Beta-Propiolacton 0,05% beträgt.
14. Monoparamunitätsinducer nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Myxomaviren lyophilisiert wurden.
15. Verwendung des Monoparamunitätsinducers nach einem der Ansprüche 1 bis 14 für die Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung.
16. Verwendung des Monoparamunitätsinducers nach einem der Ansprüche 1 bis 14 für die Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Aktivierung des paraspezifischen Immunsystems bei Mensch und Tier.
17. Verwendung des Monoparamunitätsinducers nach einem der Ansprüche 1 bis 14 für die Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur parenteralen Behandlung und/oder zur Prophylaxe von Dysfunktionen des Immunsystem, Immunsuppression, Immunschwäche-Erkrankungen, Dysfunktionen der Homöostase zwischen Hormon-, Kreislauf-, Stoffwechsel- und Nervensystem, neonataler Infektionsbedrohung, Tumorerkrankungen, Viruserkrankungen, bakteriellen Erkrankungen, therapieresistenten infektiösen Faktorenkrankheiten, viralen und bakteriellen Mischinfektionen, chronischen Manifestationen infektiöser Prozesse, Leberkrankheiten unterschiedlicher Genese, chronischen Hautkrankheiten, Herpeskrankheiten, chronischen Hepatitiden, grippalen Infekten, Endotoxinschäden.

18. Verwendung nach einem der Ansprüche 15 bis 17, wobei die Behandlung durch eine lokale Verabreichung der pharmazeutischen Zusammensetzung über die Haut oder Schleimhäute eines Patienten erfolgt.
19. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend einen Monoparamunitätsinducer nach einem der Ansprüche 1 bis 14 und einen pharmazeutisch verträglichen Träger.
20. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 19, zur lokalen oder parenteralen Applikation.
21. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 19, wobei die Zusammensetzung in Form von Buccal- und Lutschtabletten vorliegt.
22. Verfahren zur Herstellung eines Monoparamunitätsinducers basierend auf einem attenuierten Myxomavirus-Stamm des Kaninchens, umfassend die Schritte:
- Isolieren von Myxomaviren aus infiziertem Gewebe eines typisch an einer generalisierten Myxomatose erkrankten Kaninchens;
  - Adaptierung des Virus an ein permissives Zellsystem;
  - Passagierung der isolierten Viren in einer permissiven Zellkultur, bis eine Attenuierung des Virus erreicht ist.
23. Verfahren nach Anspruch 22, wobei zur Adaptierung die isolierten Viren auf die Chorioallantoismembran (CAM) bebrüteter Hühnereier geimpft werden.
24. Verfahren nach Anspruch 23, wobei das Virus über 2 bis 6 Passagen, vorzugsweise über 3 Passagen, auf der CAM vermehrt wird.
25. Verfahren nach Anspruch 22, wobei zur Isolierung der im infizierten Gewebe enthaltenden Myxomaviren diese in einem permissiven Zellsystem vermehrt werden.
26. Verfahren nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß das Virus durch Anzucht auf der Chorioallantoismembran (CAM) bebrüteter Hühnereier isoliert wird.
27. Verfahren nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, daß das Virus anschließend an die CAM über weitere Passagen, vorzugsweise über 2 weitere Passagen, adaptiert wird.

28. Verfahren nach einem der Ansprüche 22 bis 27, wobei das Virus in einer permanenten Zellkultur passagiert wird.
29. Verfahren nach Anspruch 28, wobei das Virus in einer Vero-Zellkultur passagiert wird.
30. Verfahren nach Anspruch 29, dadurch gekennzeichnet, dass die Attenuierung der Myxomaviren über 80 bis 150 Passagen, vorzugsweise über 120 Passagen, in Vero-Zellkulturen erfolgt.
31. Verfahren nach einem der Ansprüche 28 bis 30, wobei das Virus in einer binären Zellkultur passagiert wird.
32. Verfahren nach Anspruch 31, wobei das Virus in einer AVIVER-Zellkultur passagiert wird.
33. Verfahren nach Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, dass die Passagierung über 10 bis 50 Passagen, vorzugsweise über 25 Passagen, erfolgt.
34. Verfahren nach einem der Ansprüche 22 bis 33, wobei die attenuierten Myxomaviren zusätzlich über weitere Attenuierungspassagen vermehrt werden.
35. Verfahren nach Anspruch 34, wobei die Vermehrung in Vero-Affennierenzellen erfolgt.
36. Verfahren nach Anspruch 35, dadurch gekennzeichnet, dass die Weitermehrung in Vero-Zellen über 100 bis 200 Passagen erfolgt.
37. Verfahren nach einem der Ansprüche 34 bis 36, dadurch gekennzeichnet, dass die Virusernten der Zellkultur einen Infektionstiter von  $10^5$  bis  $10^{7,5}$ , vorzugsweise von mindestens  $10^{6,5}$ , TCID<sub>50</sub>/ml haben.
38. Verfahren nach einem der Ansprüche 22 bis 37, wobei die attenuierten Myxomaviren zusätzlich inaktiviert werden.
39. Verfahren nach Anspruch 38, wobei die attenuierten Myxomaviren zur Inaktivierung mit Beta-Propiolacton behandelt werden.

40. Verfahren nach Anspruch 39, dadurch gekennzeichnet, dass die Konzentration von Beta-Propiolacton 0,01-1% beträgt.

41. Verfahren nach Anspruch 40, dadurch gekennzeichnet, dass die Konzentration von Beta-Propiolacton 0,05% beträgt.

42. Verfahren nach einem der Ansprüche 22 bis 41, umfassend die Schritte:

- Isolieren von Myxomaviren aus dem infizierten Gewebe des an Myxomatose erkrankten Kaninchens durch Vermehrung auf der CAM bebrüteter Hühnereier und nachfolgender

- Adaptierung des isolierten Myxomavirus an die CAM über weitere 2 Passagen

- Attenuieren der isolierten Viren durch

- Passagierung in Vero-Zellkulturen, vorzugsweise über 120 Passagen,

- Überführung der Viren in die binäre AVIVER-Zellkultur mit weiterer Attenuierung des Virus, vorzugsweise über 24 Zwischenpassagen, in dieser Zellkultur,

- nachfolgende Rückübertragung des Virus auf Vero-Affennierenzellen, und

- Vermehren der attenuierten Myxomaviren durch weitere Attenuierungspassagen in den Vero-Zellen, vorzugsweise über etwa 150 Passagen.

43. Attenuiertes Myxomavirus, erhältlich durch das Verfahren nach einem der Ansprüche 22 bis 42.

44. Myxomavirus nach Anspruch 43, hinterlegt bei der European Collection of Cell Cultures (ECACC) unter der Hinterlegungsnummer 03121801.

45. Myxomavirus nach Anspruch 43 oder 44, dadurch gekennzeichnet, dass das Myxomavirus genetisch modifiziert ist.

46. Myxomavirus nach Anspruch 45, dadurch gekennzeichnet, dass das Myxomavirus eine Modifikation in Form einer Addition, Substitution oder Deletion in einem oder mehreren Genabschnitten, kodierend für die Bildung von Zytokin-Rezeptoren aufweisen, wobei durch die Modifikation die Rezeptoreigenschaften der Zytokin-Rezeptoren verloren gehen.

47. Myxomavirus nach Anspruch 46, dadurch gekennzeichnet, dass die Zytokin-Rezeptoren ausgewählt sind aus der Gruppe von Rezeptoren für Interferone (IFN), Interleukine (IL) und Tumornekrosefaktor (TNF).

48. Myxomavirus nach Anspruch 47, dadurch gekennzeichnet, dass die Zytokin-Rezeptoren ausgewählt sind aus der Gruppe von Rezeptoren für IFN $\alpha$ -R, IFN $\gamma$ -R, TNF-R, IL-1-R, IL-2-R, IL-6-R, IL-12-R.




Applicant's or agent's file reference <b>BN 55 PCT</b>	International application No.
---	-------------------------------

**INDICATIONS RELATING TO DEPOSITED MICROORGANISM  
OR OTHER BIOLOGICAL MATERIAL**

(PCT Rule 13bis)

A. The indications made below relate to the deposited microorganism or other biological material referred to in the description on page <u>5</u> , line <u>22-27</u>	
B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT Further deposits are identified on an additional sheet <input type="checkbox"/>	
Name of depositary institution European Collection of Cell Cultures (ECACC)	
Address of depositary institution (including postal code and country) Porton Down Salisbury SP4 0JG Wiltshire Great Britain	
Date of deposit December 18, 2003	Accession Number 03121801
C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable) This information is continued on an additional sheet <input type="checkbox"/>	
In respect of all designated States to which such action is possible and to the extent that it is legally permissible under the law of the designated State, it is requested that a sample of the deposited microorganism be made available only by the issue thereof to an independent expert, in accordance with the relevant patent legislation, e.g. EPC Rule 28(4); UK Patent Rules 1995, Schedule 2, Paragraph 3; Australian Regulation 3.25(3); Danish Patents Act Sections 22 and 33(3) and generally similar provisions mutatis mutandis for any other designated State.	
D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States)	
E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable)	
The indications listed below will be submitted to the International Bureau later (specify the general nature of the indications e.g., "Accession Number of Deposit")	

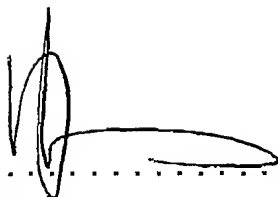
<p align="center">For receiving Office use only</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> This sheet was received with the international application</p> <p align="center"> <b>Mme. C. Rossi</b></p> <p>Authorized officer</p>	<p align="center">For International Bureau use only</p> <p><input type="checkbox"/> This sheet was received by the International Bureau on:</p> <p>Authorized officer</p>
--	---



Health Protection Agency, Porton Down  
and  
European Collection of Cell Cultures

This document certifies that  
Virus MYXOMA VIRUS-M2  
Deposit Reference 03121801

has been accepted as a patent deposit, in accordance with  
The Budapest Treaty of 1977,  
with the European Collection of Cell Cultures on  
18 December 2003



.....  
Dr D H Lewis  
General Manager  
ECACC

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL  
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS  
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

TO

BAVARIAN NORDIC A

INTERNATIONAL FORM

BAVARIAN NORDIC A/S

BOEGESKOVVEJ 9

KVIJSTGAARD

DK2490

DENMARK

NAME AND ADDRESS  
OF DEPOSITOR

## I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM

Identification reference given by the  
DEPOSITOR:

MYXOMA VIRUS-M2

Accession number given by the  
INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY:

03121801

## II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION

The microorganism identified under I above was accompanied by:

☒ A scientific description☐ A proposed taxonomic designation

(Mark with a cross where applicable)

## III. RECEIPT AND ACCEPTANCE

This International Depository Authority accepts the microorganism identified under I above,  
which was received by it on 18 December 2003 (date of the original deposit)<sup>1</sup>

## IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION

The microorganism identified under I above was received by this International  
Depository Authority on (date of the original deposit) and  
A request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty  
was received by it on (date of receipt of request for conversion)

## IV. INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY

Name: Dr D H Lewis

Address: ECACC  
HPA  
Porton Down  
Salisbury SP4 0JG

Signature(s) of person(s) having the power  
to represent the International Depository  
Authority or of authorized official(s):

Date: 5/1/05

<sup>1</sup> Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of international depository  
authority was acquired

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL  
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS  
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

TO  
BAVARIAN NORDIC A  
BAVARIAN NORDIC A/S

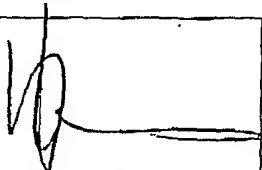
VIABILITY STATEMENT  
Issued pursuant to Rule 10.2 by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY  
identified on the following page

BOEGESKOVVEJ 9  
KVISTGAARD  
DK2490  
DENMARK

NAME AND ADDRESS OF THE PARTY  
TO WHOM THE VIABILITY OF STATEMENT  
IS ISSUED

I. DEPOSITOR	II. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM
<p>Name: BAVARIAN NORDIC A BAVARIAN NORDIC A/S</p> <p>Address: BOEGESKOVVEJ 9 KVISTGAARD DK2490 DENMARK</p>	<p>Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY:  03121801</p> <p>Date of the deposit or of the transfer:  18 December 2003</p>
<p>II. VIABILITY STATEMENT</p> <p>The viability of the microorganism identified under II above was tested on 18 December 2003<sup>2</sup>. On that date, the said microorganism was</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> <sup>1</sup> viable</p> <p><input type="checkbox"/> <sup>1</sup> no longer viable</p>	

- 1 Indicate the date of the original deposit or, where a new deposit or a transfer has been made, the most relevant date (date of the new deposit or date of the transfer).
- 2 In the cases referred to in Rule 10.2 (a) (ii) and (iii), refer to the most recent viability test.
- 3 Mark with a cross the applicable box.

IV. CONDITIONS UNDER WHICH THE VIABILITY TEST HAS BEEN PERFORMED <sup>4</sup>		
THE PATENT DEPOSIT MYXOMA VIRUS-M2 - 03121801 PASSED ITS VIABILITY TEST BY THE APPEARANCE OF CYTOPATHIC EFFECT IN VERO CELLS AFTER 6 DAYS.		
II. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY		
Name:	Dr D H Lewis	
	ECACC HPA	
Address:	Porton Down	
	Salisbury	
	Wiltshire	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):
	SP4 OJG	Date: 5/1/05

<sup>4</sup> Fill in if the information has been requested and if the results of the test were negative.

Form BP/9 (second and last page)

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP2005/000582

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K39/275 A61K35/76 C12N7/06 C12N7/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, PAJ

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>MOSSMAN KAREN ET AL: "Myxoma virus M-T7, a secreted homolog of the interferon-gamma receptor, is a critical virulence factor for the development of myxomatosis in European rabbits"</p> <p>VIROLOGY, vol. 215, no. 1, 1996, pages 17-30, XP002331300 ISSN: 0042-6822 figure 1 tables 1,2</p> <p style="text-align: center;">----- -/--</p>	<p>1-6, 15, 18-20, 43, 45-48</p>



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \* & \* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 June 2005

Date of mailing of the international search report

01/07/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Brouns, G

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP2005/000582

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>UPTON C ET AL: "MYXOMA VIRUS EXPRESSES A SECRETED PROTEIN WITH HOMOLOGY TO THE TUMOR NECROSIS FACTOR RECEPTOR GENE FAMILY THAT CONTRIBUTES TO VIRAL VIRULENCE" VIROLOGY, vol. 184, no. 1, 1991, pages 370-382, XP008048426 ISSN: 0042-6822 figure 2 table 1</p>	1-6, 15, 18-20, 43, 45-48
X	<p>SAITO J K ET AL: "ATTENUATION OF THE MYXOMA VIRUS AND USE OF THE LIVING ATTENUATED VIRUS AS AN IMMUNIZING AGENT FOR MYXOMATOSIS." THE JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES. DEC 1964, vol. 114, December 1964 (1964-12), pages 417-428, XP008048380 ISSN: 0022-1899</p>	1, 8, 9, 14, 15, 18-20, 22, 23, 25-28, 34, 37, 43
Y	<p>page 417, right-hand column, paragraph 3 - page 420, left-hand column  table 1</p>	10-13, 16, 17, 38-42
X	<p>MCCABE V J ET AL: "Vaccination of cats with an attenuated recombinant myxoma virus expressing feline calicivirus capsid protein" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC. GUILDFORD, GB, vol. 20, no. 19-20, 7 June 2002 (2002-06-07), pages 2454-2462, XP004359675 ISSN: 0264-410X page 2455, left-hand column, paragraph 2.1 tables 1, 2</p>	1, 8, 15, 18, 19, 22, 43, 45
Y	<p>EP 0 669 133 A (MAYR, ANTON, PROF. DR.MED.VET. DR.H.C.MULT) 30 August 1995 (1995-08-30) cited in the application page 3, lines 29-40 page 5, lines 20-26 table 4</p>	10-13, 16, 17, 38-42
A	<p>BUETTNER M: "Principles of paramunization: Option and limits in veterinary medicine" COMPARATIVE IMMUNOLOGY MICROBIOLOGY AND INFECTIOUS DISEASES, vol. 16, no. 1, 1993, pages 1-10, XP008048490 ISSN: 0147-9571 the whole document</p>	1, 6-44

-----  
-/--

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP2005/000582

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MAYR A ET AL: "A NEW CONCEPT IN PROPHYLAXIS AND THERAPY: PARAMUNIZATION BY PROXVIRUS INDUCERS" PESQUISA VETERINARIA BRASILEIRA - BRASILIAN JOURNAL OF VETERINARY RESEARCH, ARMANDO AMORIM PUBLICIDADE, RIO DE JANEIRO, BR, vol. 19, no. 3/4, July 1999 (1999-07), pages 91-98, XP001033983 cited in the application the whole document	1,6-44
A	NASH PIERS ET AL: "Immunomodulation by viruses: The myxoma virus story" IMMUNOLOGICAL REVIEWS, vol. 168, no. 0, April 1999 (1999-04), pages 103-120, XP008048415 ISSN: 0105-2896 figure 1 tables 1,2	1-5, 45-48



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2005/000582

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0669133	A	30-08-1995	DE 4405841 C1	05-01-1995
			AT 153242 T	15-06-1997
			AU 690625 B2	30-04-1998
			AU 1416795 A	11-09-1995
			BR 9506882 A	19-08-1997
			CA 2182207 A1	31-08-1995
			CN 1142187 A	05-02-1997
			DE 59402826 D1	26-06-1997
			DK 669133 T3	14-07-1997
			WO 9522978 A1	31-08-1995
			EP 0669133 A1	30-08-1995
			ES 2102081 T3	16-07-1997
			FI 963277 A	22-08-1996
			GR 3023508 T3	29-08-1997
			HU 75545 A2	28-05-1997
			JP 2873880 B2	24-03-1999
			JP 9504803 T	13-05-1997
			KR 196204 B1	15-06-1999
			NO 963462 A	20-08-1996
			NZ 278079 A	26-01-1998
			PL 316024 A1	23-12-1996
			SI 669133 T1	31-10-1997
			US 6805870 B1	19-10-2004

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 A61K39/275 A61K35/76 C12N7/06 C12N7/08

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 A61K C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, PAJ

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>MOSSMAN KAREN ET AL: "Myxoma virus M-T7, a secreted homolog of the interferon-gamma receptor, is a critical virulence factor for the development of myxomatosis in European rabbits"</p> <p>VIROLOGY, Bd. 215, Nr. 1, 1996, Seiten 17-30, XP002331300 ISSN: 0042-6822 Abbildung 1 Tabellen 1,2</p> <p style="text-align: center;">----- -/-</p>	<p>1-6, 15, 18-20, 43, 45-48</p>



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

- \*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- \*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- \*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- \*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- \*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*G\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

24. Juni 2005

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

01/07/2005

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Brouns, G

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>UPTON C ET AL: "MYXOMA VIRUS EXPRESSES A SECRETED PROTEIN WITH HOMOLOGY TO THE TUMOR NECROSIS FACTOR RECEPTOR GENE FAMILY THAT CONTRIBUTES TO VIRAL VIRULENCE" VIROLOGY, Bd. 184, Nr. 1, 1991, Seiten 370-382, XP008048426 ISSN: 0042-6822 Abbildung 2 Tabelle 1</p>	1-6,15, 18-20, 43,45-48
X	<p>SAITO J K ET AL: "ATTENUATION OF THE MYXOMA VIRUS AND USE OF THE LIVING ATTENUATED VIRUS AS AN IMMUNIZING AGENT FOR MYXOMATOSIS." THE JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES. DEC 1964, Bd. 114, Dezember 1964 (1964-12), Seiten 417-428, XP008048380 ISSN: 0022-1899</p>	1,8,9, 14,15, 18-20, 22,23, 25-28, 34,37,43
Y	<p>Seite 417, rechte Spalte, Absatz 3 - Seite 420, linke Spalte  Tabelle 1</p>	10-13, 16,17, 38-42
X	<p>MCCABE V J ET AL: "Vaccination of cats with an attenuated recombinant myxoma virus expressing feline calicivirus capsid protein" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC. GUILDFORD, GB, Bd. 20, Nr. 19-20, 7. Juni 2002 (2002-06-07), Seiten 2454-2462, XP004359675 ISSN: 0264-410X Seite 2455, linke Spalte, Absatz 2.1 Tabellen 1,2</p>	1,8,15, 18,19, 22,43,45
Y	<p>EP 0 669 133 A (MAYR, ANTON, PROF. DR.MED.VET. DR.H.C.MULT) 30. August 1995 (1995-08-30) in der Anmeldung erwähnt Seite 3, Zeilen 29-40 Seite 5, Zeilen 20-26 Tabelle 4</p>	10-13, 16,17, 38-42
A	<p>BUETTNER M: "Principles of paramunization: Option and limits in veterinary medicine" COMPARATIVE IMMUNOLOGY MICROBIOLOGY AND INFECTIOUS DISEASES, Bd. 16, Nr. 1, 1993, Seiten 1-10, XP008048490 ISSN: 0147-9571 das ganze Dokument</p>	1,6-44
	-/-	

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	MAYR A ET AL: "A NEW CONCEPT IN PROPHYLAXIS AND THERAPY: PARAMUNIZATION BY PROXVIRUS INDUCERS" PESQUISA VETERINARIA BRASILEIRA - BRASILIAN JOURNAL OF VETERINARY RESEARCH, ARMANDO AMORIM PUBLICIDADE, RIO DE JANEIRO, BR, Bd. 19, Nr. 3/4, Juli 1999 (1999-07), Seiten 91-98, XP001033983 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument -----	1,6-44
A	NASH PIERS ET AL: "Immunomodulation by viruses: The myxoma virus story" IMMUNOLOGICAL REVIEWS, Bd. 168, Nr. 0, April 1999 (1999-04), Seiten 103-120, XP008048415 ISSN: 0105-2896 Abbildung 1 Tabellen 1,2 -----	1-5, 45-48

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2005/000582

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0669133 A	30-08-1995	DE 4405841 C1	05-01-1995
		AT 153242 T	15-06-1997
		AU 690625 B2	30-04-1998
		AU 1416795 A	11-09-1995
		BR 9506882 A	19-08-1997
		CA 2182207 A1	31-08-1995
		CN 1142187 A	05-02-1997
		DE 59402826 D1	26-06-1997
		DK 669133 T3	14-07-1997
		WO 9522978 A1	31-08-1995
		EP 0669133 A1	30-08-1995
		ES 2102081 T3	16-07-1997
		FI 963277 A	22-08-1996
		GR 3023508 T3	29-08-1997
		HU 75545 A2	28-05-1997
		JP 2873880 B2	24-03-1999
		JP 9504803 T	13-05-1997
		KR 196204 B1	15-06-1999
		NO 963462 A	20-08-1996
		NZ 278079 A	26-01-1998
		PL 316024 A1	23-12-1996
		SI 669133 T1	31-10-1997
		US 6805870 B1	19-10-2004